повысилось, но было в 2,4 раза меньше, чем в контроле. При повышении процентного содержания ЭС до 50% количество жизнеспособных клеток увеличилось в 1,5 раза по сравнению с предыдущим показателем. Замораживание клеток культуры в ЭС позволило сохранить 76±1% жизнеспособных клеток, что достоверно меньше контрольного показателя и показателя, полученного при замораживании по программе № 1.

Как видно из приведенных данных, использование программы №1 более эффективно по сравнению с программой № 2.

При культивировании клеток ФЭЧ после криоконсервирования было установлено, что клетки после замораживания в ростовой среде и с 20% содержанием сыворотки адгезировали и распластывались единично и не обладали способностью к дальнейшей пролиферации. В пробах, где процент ЭС составлял 50% и 100%, наблюдали пролиферация клеток с образованием монослоя, но на 3-4 дня позже, чем в контроле, т.е. на 7-8 сутки.

Можно сделать следующие выводы:

• клетки не теряют способность к адгезии и пролиферации после криоконсервирования в среде, содержащей ЭС без добавления криопротекторов;

• количество жизнеспособных клеток увеличивается с повышением процентного содержания ЭС в среде замораживания;

• программа № 1 оптимальна для замораживания клеток культуры ЭФЧ в среде, не содержащей криопротекторы.

Таким образом, возможно использовать сыворотку крови в качестве среды для криоконсервирования культуры клеток человека. Использование бескриопротекторной среды, не требующей отмывания перед использованием клеток, снижает количество манипуляций с материалом и риск контаминации. Мы предполагаем возможность использования сыворотки аутологичной крови пациента в качестве среды криохранения запаса собственных клеток человека.

SUMMARY

We have cryopreserved the human fibroblast culture in medium containing fetal bovine serum with no cryoprotectants. There were 63±2% viable cells in the medium with 50% FBS and 90±1% viable cells in 100% FBS after cryopreservation. The two cryopreservation programs were used and it was determined that the first one with 30-40° per minute down to -28°C with stopping for 15 min and subsequent immersion into liquid nitrogen is optimal. It is possible to cryopreserve the human diploid cells with high survival in medium with no cryoprotectants.

Литература

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир 1983. 264 с.
2. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. Киев.: Наукова думка. 1979. 100 с.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев.: Наукова думка. 1994. С. 32–200.
4. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н.. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. Л.: Медицина. 1976. 224 с
5. Грищенко В.И., Юрченко Г.Г. Влияние факторов низкотемпературного консервирования на репродуктивные, эмбриональные и фетальные клетки // Проблемы криобиологии. 1998. № 4. С. 7-13.
6. Грищенко В.И. Достижения и перспективы развития клеточной и тканевой терапии // Международный мед. журнал. 1999. № 4. С. 6-10.
7. Культура животных клеток. Методы. Под ред. Р.Фрешни. М.: Мир. 1989. 333 с., ил.
8. Методы культивирования клеток. Сборник научных трудов. Отв. ред. Г.П. Пинаев. Л.: Наука. 1988. 287 с.
9. Петренко Т.Ф. Влияние криоконсервирования на морфо-функциональные свойства клеток перевиваемых культур. Автореферат диссертации на соискание научной степени кандидата биологических наук. Харьков 1986.

И.Ш. Шапиев, Е.В. Никиткина

ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных

ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ НА ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Одной из задач в реализации программы сохранения генетических ресурсов является разработка методов криоконсервации и оценки функционального состояния сперматозоидов животных до и после криоконсервации.

Одним из наиболее чувствительных к повреждающему действию низких темпе-

ратур структур клеток являются митохондрии. В связи с этим изучали влияние охлаждения и замораживания-оттаивания на состояние дыхательной цепи митохондрий сперматозоидов хряков и петухов.

Исследовали редокс-реакции пиридиновых (НАД.Н) и флавиновых (ФАД) нуклеотидов при разбавлении, охлаждении и замораживании-оттаивании сперматозоидов хряков и петухов с использованием ингибитора дыхания антимицина А и разобщителя дыхания 2,4-динитрофенола (ДНФ).

Для измерения флюоресценции использовали микроскоп ЛЮМАМ И-3 с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1, блоком регистрации опорного сигнала и контактным объективом 10х. Объект освещали через микроскоп возбуждающим светом 365 нм для НАД.Н и регистрировали флуоресценцию при 436 нм, а для ФАД при 436 нм и 530 нм соответственно. Проводили по 6 и более измерений, до получения постоянного значения. Количество НАД.Н и ФАД выражали в условных единицах и рассчитывали изменение флуоресценции после каждой добавки в % от исходной, принятой за 100%.

На табл.1 представлены данные, показывающие влияние различных воздействий на флуоресценцию НАДН и ФАД.

При разбавлении спермы хряков глюкозо-хелато-цитратно-калиевой средой (ГХЦК) наблюдается некоторое увеличение НАД.Н. При разбавлении спермы в физиологическом растворе наблюдается уменьшение восстановленного НАД.Н и увеличение ФАД вследствие усиления окислительных процессов и снижения количества эндогенных и отсутствия экзогенных субстратов дыхания. Холодовой шок неразбавленной спермы приводит к значительному снижению НАДН и ФАД, что указывает на повреждение дыхательной цепи митохондрий. В то же время холодовой шок спермы после ее разбавления защитной средой не вызывал столь резкого снижения НАДН.

Субстрат дыхания сукцинат сдвигает флуоресценцию на 5-7% в сторону увеличения лишь в отдельных эякулятах. Отсутствие реакции, или слабая реакция на добавление субстрата, связана с тем, что сукцинат не проникает в интактные сперматозоиды. Это согласуется с данными полярографических исследований дыхания сперматозоидов.

2,4-ДНФ снижает флуоресценцию НАД.Н и ФАД в свежей сперме на 68 и 61%, а в замороженно-оттаянной - на 47 и 27%. Добавление ингибитора дыхания антимицина после 2,4-ДНФ в увеличивает флуоресценцию НАД.Н и ФАД в свежей сперме на 46 и 74%.

После охлаждения и замораживания спермы снижается чувствительность дыхания к амиталу и антимицину. Это указывает на активацию внешнего пути окисления НАД.Н. Результаты оценки редокс-состояния ПН и ФП в сперматозоидах хряка, полученные флуоресцентным методом полностью согласуются с данными полярографической оценки. Наибольшее снижение чувствительности дыхания к амиталу (1-й пункт сопряжения), обусловленное повреждением начального НАД.Н зависимого пути, наблюдали на этапе охлаждения спермы до 5-4° С.

В замороженно-оттаянной сперме табл.2 количество НАД.Н в усл. ед. на 25% ниже, а окисленного ФАД на 100% выше, чем в свежеразбавленной сперме. Следовательно, после замораживания-оттаивания спермы увеличивается степень окисленности ПН и ФП. Субстраты дыхания (сукцинат калия, пируват натрия) лишь на 5-7% увеличивают флуоресценцию ПН и ФП в свежей и замороженно-оттаянной сперме. 2,4-ДНФ снижает флуоресценцию НАД.Н и ФАД в свежей сперме на 68 и 61%, а в замороженно-оттаянной - на 47 и 27%. Ингибитор дыхания увеличивает флуоресценцию НАД.Н и ФАД в свежей сперме на 46 и 74%, а после замораживания и оттаива-

Таблица 1

Влияние среды и холодового удара на флуоресценцию НАД.Н и ФАД в сперме хряков

Вариант	Флюоресценция, %	
	НАД.Н	ФАД
Свежеполученная неразбавленная сперма (контроль)	100	100
Разбавленная ГХЦК средой	119	102
Разбавленная 0,85% NaCl	90	120
Сперма, подвергнутая холодовому удару	67	79
Сперма, подвергнутая холодовому удару после разбавления средой	83	108

Таблица 2

Влияние охлаждения и замораживания сперматозоидов на содержание НАДН и ФАД и их процентное соотношение при различных функциональных тестах (n = 10)

Вариант	Интенсивность флюоресценции			
	Свежеполученная сперма		Заморожено-оттаянная	
	НАД.Н, %	ФАД, %	НАД.Н, %	ФАД, %
Свежеразбавленная: усл. ед.	12±1,7	3±0,4	9±0,5	6±0,9
%	100	100	100	100
+ пируват + сукцинат	105±5,5	107±3,5	102±3,9	106±6,6
+ ДНФ	37±5,9	46±7,6	49±3,9	79±4,9
+ антимицин	83±12	120±19,0	64±5,2	82±4,7

ния лишь на 15 и 3%, т.е. реакция сперматозоидов на добавление 2,4-ДНФ и ингибитораов дыхания после замораживания-оттаивания снижается. Это свидетельствует о разобщении и частичном нарушении начального НАД.Н зависимого участка дыхательной цепи.

Сравнительное исследование дыхания сперматозоидов хряков и петухов показало идентичность в характере ответных реакций на действие сукцината, 2,4-динитрофенола и антимицина А. Различия заключались лишь в силе ответа на действие тестирующих веществ.

Таким образом, после температурного шока полностью нарушается регуляция электронно-транспортной системы спермотозоидов, после замораживания-оттаивания имеет место разобщение и частичное нарушение начального НАД - зависимого участка дыхательной цепи. Следовательно, при совершенствовании метода криоконсервации спермы необходимо вести изыскание способов защиты 1-го пункта (участка) дыхательной цепи как наиболее чувствительного.

РЕЗЮМЕ

Исследовали редокс-реакции НАД.Н и ФАД при разбавлении, охлаждении и замораживании-оттаивании сперматозоидов хряков и петухов с использованием ингибитора дыхания антимицина А и разобщителя дыхания 2,4-динитрофенола (ДНФ). Установлено, что холодовой шок неразбавленной спермы приводит к резкому снижению количества НАД.Н и ФАД.

После замораживания-оттаивания сперматозоидов наблюдается увеличение окисленности НАД и ФАД и снижение реакции на добавление ДНФ и антимицина. Результаты оценки редокс-состояния НАД и ФАД , полученые флюоресцентным методом, согласуются с полярографическими данными по реакции дыхания сперматозоидов в ответ на действие ингибиторов дыхания и ДНФ после охлаждения и замораживания-оттаивания спермы.

SUMMARY

Redox-reactions of NAD.H and FAD of boar and cock sperm during diluting, cooling and freezing - thawing were studied. 2,4-dinitrophenol (DNP) and antimycin were used as testing substances. It was established, that cold shock of undiluted sperm results in great reduction of NAD.H and FAD amount.

The growth of oxidation of NAD and FAD sperm after freezing - thawing was observed. Reduction of reaction on injecting 2,4-DNP and antimycin was as well. The results of estimation of a redox-condition NAD and FAD provided by a fluorescent method well correlated with data of polarographic estimation of spermatozoa respiration after cooling and freezing - thawing.

УДК: 57.085.23:615.014.41

Л.Г. Абрафикова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (ИПКиК)

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОХРАННОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПОД ЗАЩИТОЙ И БЕЗ КРИОПРОТЕКТОРА

Изучали жизнеспособность фибробластов человека после криоконсервирования с криопротектором ДМСО (10%) и без него.

Суспензию клеток в ростовой среде 199 и в среде 199 с добавлением 10% ДМ-